

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462748

研究課題名(和文)好中球の活性化におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2の役割

研究課題名(英文) Roles of calcium-independent phospholipase A2 in neutrophil cytotoxicity

研究代表者

相星 淳一 (Aiboshi, Junichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50256913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼA2(PLA2)は、分泌型PLA2(sPLA2)、細胞質PLA2(cPLA2)、カルシウム非依存性PLA2(iPLA2)に大別される。sPLA2やcPLA2と比較して、急性炎症におけるiPLA2の役割は十分に解明されていない。本研究では、iPLA2が好中球の生物活性(活性酸素産生、脱顆粒、遊走能、接着能、接着分子発現)や微小循環における白血球と血管内皮細胞の相互作用に関与することを明らかにした。このように、iPLA2は急性炎症の過程に不可欠な酵素であるかもしれない。さらに、アラキドン酸以外にiPLA2の代謝産物が好中球機能の情報伝達物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase A2 (PLA2) consists of secretory PLA2 (sPLA2), cytosolic PLA2 (cPLA2), and calcium independent PLA2 (iPLA2). Compared to sPLA2 and cPLA2, roles of the iPLA2 enzyme in acute inflammation remain ill defined. Our current studies have demonstrated that iPLA2 may be involved in multiple neutrophil cytotoxic functions (extracellular superoxide production, degranulation, chemotaxis, adhesion, adhesion molecule surface expression) as well as the leukocyte-endothelial cell interaction in rat mesenteric microcirculation. Thus the iPLA2 enzyme may be essential for acute inflammatory process. In addition, iPLA2-associated metabolites other than arachidonic acid are likely to be signaling molecules of neutrophil cytotoxicity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ホスホリパーゼA2 カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2 好中球 急性炎症

### 1. 研究開始当初の背景

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>; PLA<sub>2</sub>) は、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの生理活性脂質の前駆体であるアラキドン酸を膜リン脂質から遊離する酵素で、現在、哺乳類では 16 の分子種が同定されている。これらの分子種は、構造的に 3 つのサブタイプ、分泌型 PLA<sub>2</sub> (secretory PLA<sub>2</sub>; sPLA<sub>2</sub>)、細胞質 PLA<sub>2</sub> (cytosolic PLA<sub>2</sub>; cPLA<sub>2</sub>)、カルシウム非依存性 PLA<sub>2</sub> (calcium independent PLA<sub>2</sub>; iPLA<sub>2</sub>) に大別される。iPLA<sub>2</sub> の生理機能に関するこれまでの研究によると、膜リン脂質のリモデリング、エイコサノイドの産生、細胞内シグナリング、細胞増殖、アポトーシス、カルシウムの細胞内取り込みなど生体にとって重要な機能が確認されている。しかしながら、炎症病態における iPLA<sub>2</sub> の役割は、sPLA<sub>2</sub> や cPLA<sub>2</sub> のように十分に解明されていない。

急性炎症における sPLA<sub>2</sub>、cPLA<sub>2</sub>、iPLA<sub>2</sub> の関与について網羅的に検討した *in vivo* 研究によると、iPLA<sub>2</sub> は sPLA<sub>2</sub> や cPLA<sub>2</sub> より早期 (2 ~ 24 時間) に発現し、胸腔内への炎症細胞の浸潤や platelet activating factor (PAF) や leukotriene B<sub>4</sub> などの炎症性メディエータの産生に参与することが報告されている。このように、iPLA<sub>2</sub> は、好中球などの免疫細胞が炎症部位に集積して生体を防御する早期の炎症過程に必要な不可欠な酵素かもしれない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、iPLA<sub>2</sub>β、iPLA<sub>2</sub>γ、sPLA<sub>2</sub>、cPLA<sub>2</sub> に対する特異的阻害剤を用いて、ヒト好中球の生物活性 (活性酸素産生、脱顆粒、遊走能、接着能、接着分子発現) への関与について *in vitro* で検証するとともに、生体顕微鏡を使用して、白血球と血管内皮細胞の相互作用における iPLA<sub>2</sub> の役割について *in vivo* で検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト好中球の生物活性 (活性酸素産生、エラスターゼ放出、遊走能、接着能、接着分子発現) の測定

#### 活性酸素産生

ヒト好中球は、健康人から Ficoll-Paque density gradient centrifugation によって分離された後、KRPD 溶液で最終濃度 ( $2.5 \times 10^7$  cells/mL) に調整された。

細胞外の superoxide の測定は、superoxide dismutase (SOD)-inhibitable cytochrome c reduction 法を用いた。分離したヒト好中球を、iPLA<sub>2</sub>β、iPLA<sub>2</sub>γ、cPLA<sub>2</sub> の特異的阻害剤である (E)-6-(bromoethylene)-3-(1-naphthalenyl)-2H-tetrahydropyran-2-one (S-BEL)、R-BEL、N-[[[2S,4R)-1-[2-(2,4-difluorobenzoyl)benzoyl]-4-(triphenylmethyl)thio]-2-pyrrolidinyl]methyl]-4-[(Z)-(2,4-dioxo-5-thiazolidinylidene)methyl]-benzamide (pyrrophenone) あるいは DMSO と

37 で 10 分間振盪した。その後、好中球 ( $3.75 \times 10^5$  cells) を  $1 \mu\text{M}$  の N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)、200 ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) あるいは KRPD で活性化した。吸光度の変化を 20 秒おきに 5 分間測定した。時間当たりの最大変化量の平均 (5 ポイント) を  $\text{O}_2^-$  Vmax ( $\text{O}_2^- / 3.75 \times 10^5$  cells/min) として計算した。

#### エラスターゼ遊離

ヒト好中球から遊離したエラスターゼの測定は、エラスターゼ特異的基質である N-methoxy succinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide を用いて行った。分離したヒト好中球に S-BEL、R-BEL、pyrrophenone、あるいは DMSO を添加し、温浴槽内で 10 分間振盪した。その後、細胞 ( $1.5 \times 10^6$  cells) を fMLP ( $1 \mu\text{M}$ )、PMA (200 ng/mL) あるいは KRPD で 37 10 分間活性化した。その上清にエラスターゼ特異的基質を添加し、遊離した p-nitroanilide を吸光度計 (405 nm) で測定した。

#### 遊走能

ヒト好中球の遊走能は Boyden chamber (フィルター孔径:  $3 \mu\text{m}$ ) を使用して測定した。分離したヒト好中球に S-BEL、R-BEL、pyrrophenone、あるいは DMSO を添加し、温浴槽内で 10 分間振盪した。Hank's balanced salt solution (HBSS) で調整された細胞 ( $1.25 \times 10^6$  cells) を Boyden chamber の upper chamber に加え、10 分間 37 で沈降させた。その後、lower chamber に fMLP ( $1 \mu\text{M}$ )、PAF (200 ng/mL) あるいは KRPD を添加した。37 60 分間静置した後、lower chamber に遊走した細胞を定量した。

#### 接着能

ヒト好中球の接着能はフィブリノーゲンを被覆したマイクロプレート (48 ウェル) を使用して評価した。細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) を S-BEL、R-BEL、pyrrophenone、[[[3-(aminooxoacetyl)-2-ethyl-1-(phenylmethyl)-1H-indol-4-yl]oxy] acetate (varespladib) あるいは DMSO とともに 37 の恒温槽内で 10 分間振盪した。その後、fMLP ( $1 \mu\text{M}$ )、PAF ( $2 \mu\text{M}$ ) あるいは KRPD で 37 10 分間活性化した。反転したマイクロプレートを 5 分間 250 G で遠心分離し、非接着の細胞を除去した。ウェル内に残存した細胞を定量した。

#### β<sub>2</sub> インテグリン接着分子発現

健康人の全血を使用して、ヒト好中球表面に発現した Mac-1 をフローサイトメトリーで測定した。全血を S-BEL、R-BEL、pyrrophenone、varespladib、あるいは DMSO とともに 37 の恒温槽内で 10 分間振盪した後、fMLP ( $1 \mu\text{M}$ )、PAF (200 nM) あるいは KRPD で 37 10 分間活性化した。その後、phycoerythrin (PE)

-labeled anti-human MAC-1 antibody あるいは isotype antibody を加え、4 - 30 分間暗所に静置した。赤血球を溶血後、フローサイトメトリーで Mac-1 の発現を測定した。

(2) 腸間膜微小循環における白血球-血管内皮細胞の相互作用の生体顕微鏡による検討

生体顕微鏡によるラット腸間膜の観察

吸入麻酔下 (1 - 2%) で、雄性 Wistar ラット (185 ± 12 g) に R-BEL (0.4 mg/kg)、S-BEL (0.04 mg/kg)、pyrrophenone (0.3 mg/kg)、varespladib (1.0 mg/kg)、あるいは DMSO (0.25%) を腹腔内投与した。その 30 分後、腹部を正中切開して腹外に誘導した腸管の一部を、持続還流している Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.3 - 7.4) の恒温槽 (37 °C) に浸水して腸間膜を展開固定した。その後、生体顕微鏡下に分岐しない最適な径の細静脈 (20 - 30 μm) を選択した。

腸間膜における白血球-血管内皮細胞の相互作用の過程を観察するため、炎症を模擬する目的で PAF を還流液に添加した (最終濃度: 200 nM)。白血球のローリングおよび接着の定義は、以下のように規定した。ローリングは 1 分間に血管内皮細胞上を赤血球よりも低速で移動する細胞数とし、接着は 5 分間に血管長 100 μm の範囲で、30 秒以上内皮細胞上に停止した細胞数とした。微小血管における白血球の動態を、PAF 添加前に 5 分間と添加 60 分後に 5 分間録画して評価した。

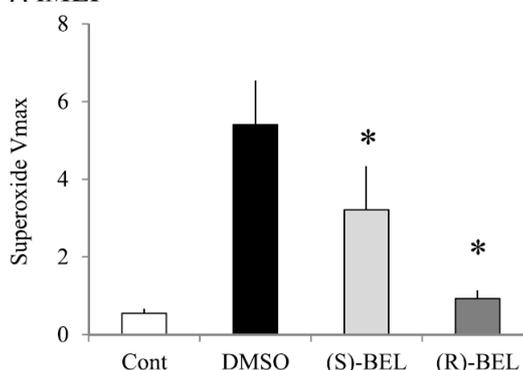
#### 4. 研究成果

(1) ヒト好中球の生物活性の発現機序における  $iPLA_2\gamma$  の役割

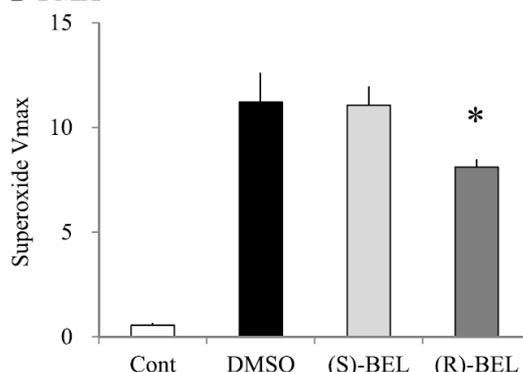
$iPLA_2$  の特異的阻害剤である bromoenol lactone (BEL) は鏡像異性体であり、S-BEL は  $iPLA_2\beta$  を、R-BEL は  $iPLA_2\gamma$  を特異的に阻害する。しかしながら、これらの阻害剤は相互に濃度依存的に抑制することも知られている。我々の研究で使用した S-BEL (5 μM) は  $iPLA_2\beta$  および  $iPLA_2\gamma$  の酵素活性をそれぞれ 100%、20% 抑制する。一方、R-BEL (20 μM) は、 $iPLA_2\gamma$  の活性をほぼ完全に抑制し、 $iPLA_2\beta$  の酵素活性を半減させる。

細胞外 superoxide 産生の結果について、R-BEL は、PMA 刺激 (非受容体依存性) よりも fMLP 刺激 (受容体依存性) による活性酸素産生を濃度依存的にほぼ完全に抑制すること (図 1)、そして、S-BEL による阻害効果は部分的あるいは無効であることから (図 1)  $iPLA_2\gamma$  は、 $iPLA_2\beta$  と比較して受容体依存性および非受容体依存性のシグナル伝達経路に強く関与することが示唆された。一方、pyrrophenone は活性化刺激による superoxide 産生を阻害できなかったことから、 $cPLA_2$  酵素はその産生機序に関与しない可能性がある (図 1)。

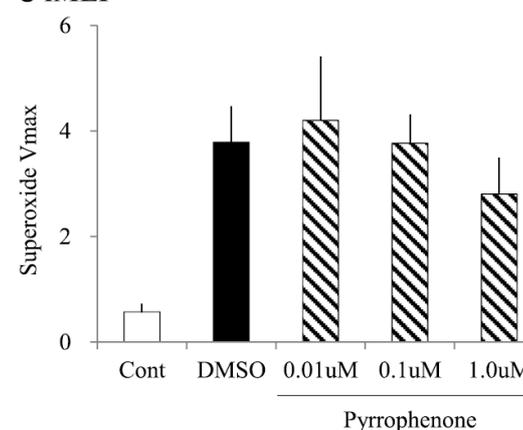
#### A fMLP



#### B PMA



#### C fMLP



#### D PMA

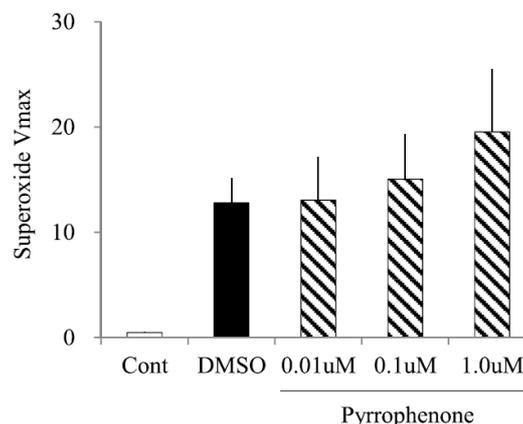


図 1

ヒト好中球のエラスターゼ遊離に関して、R-BEL は受容体依存性および非受容体依存性刺激による脱顆粒を完全に抑制し、S-BEL は部分的に阻害した (図 2)。一方、エラスター

ーゼの遊離に対する pyrrophenone の阻害効果はいずれの濃度でも確認できなかった(図2)

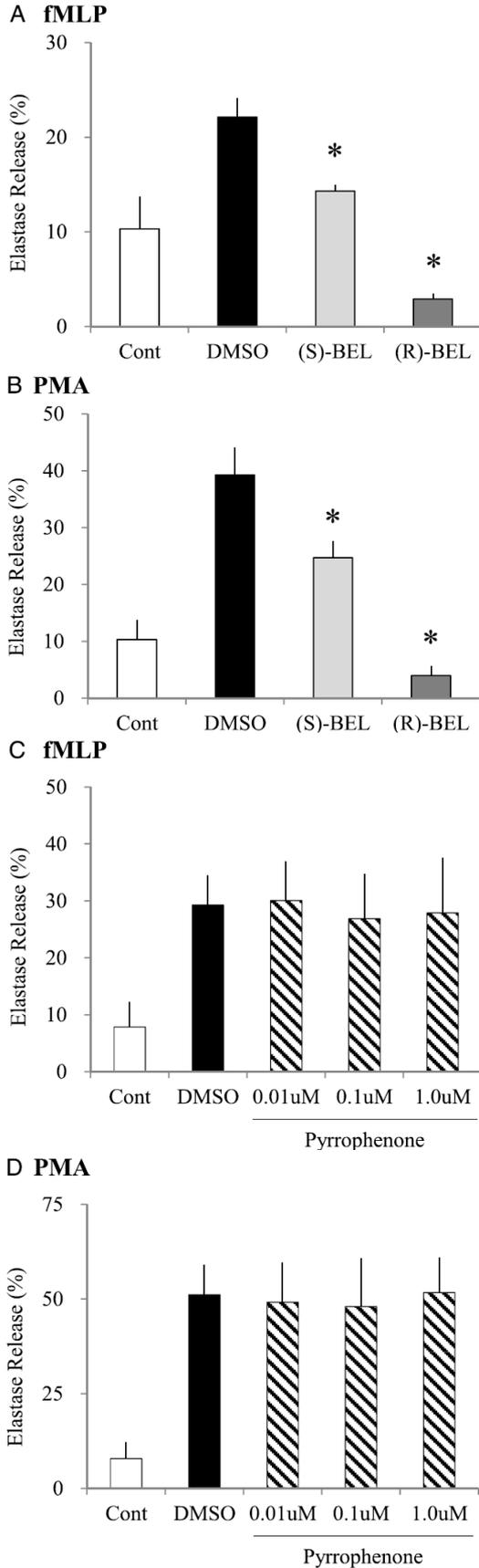


図 2

代表的な走化性物質である fMLP および PAF に対する遊走能の検討では、R-BEL は

lower chamber へのヒト好中球の遊走を完全に抑制した(図3)。しかしながら、S-BEL や pyrrophenone は阻害しなかった(図3)

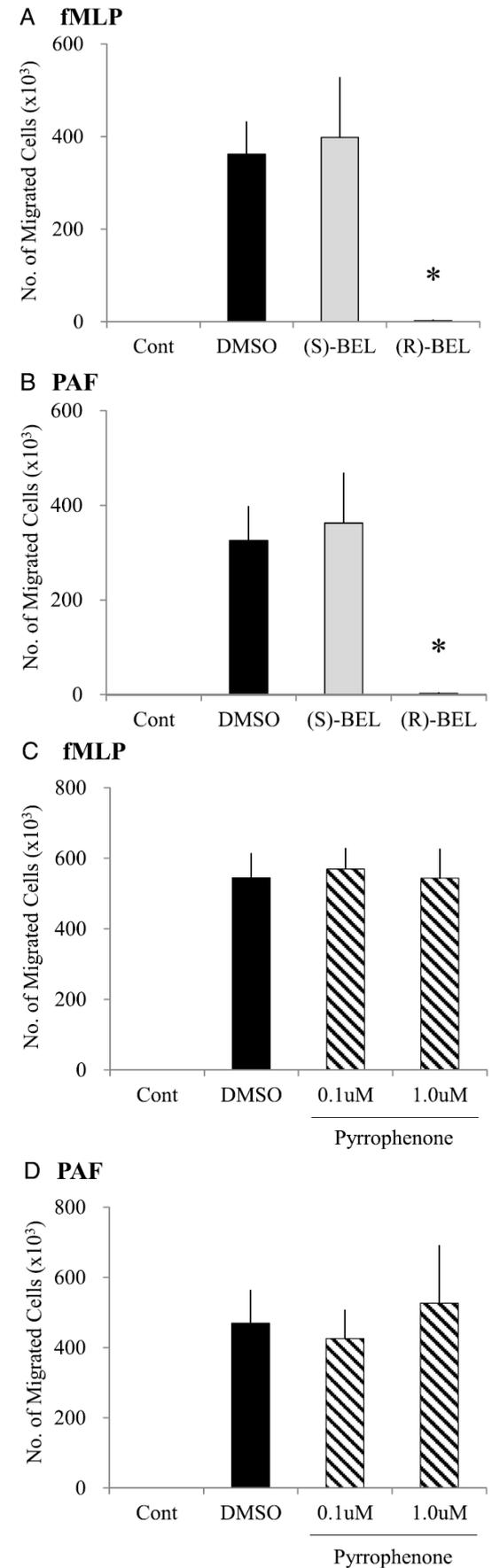


図 3

2種類の活性化物質（fMLP、PAF）によって誘導される接着能について、R-BELはヒト好中球のフィブリノーゲンへの接着を完全に抑制したが、S-BEL、pyrrophenone、varespladibによる阻害は全く無効であった（図4）

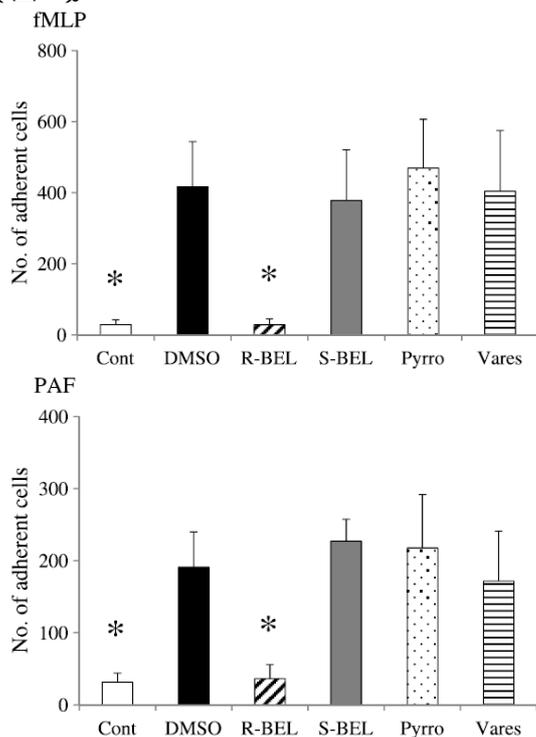


図4

細胞接着にも関連する $\beta_2$ インテグリンの発現について検討を行った。R-BELは、fMLPやPAFに反応した接着分子発現の増加を部分的に抑制した（図5）。一方、他のPLA<sub>2</sub>特異的阻害剤の効果は認められなかった（図5）

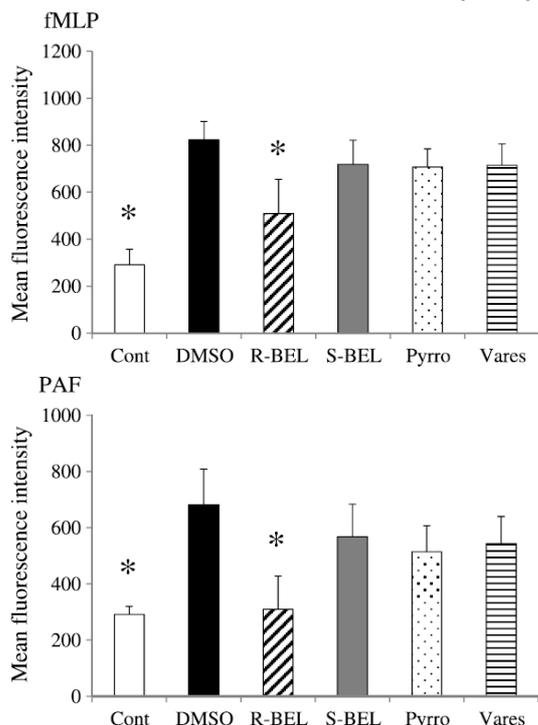
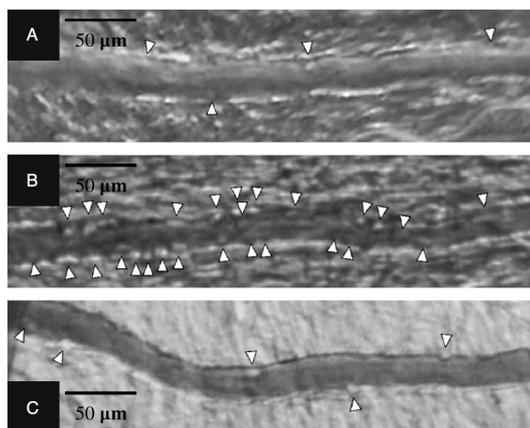


図5

(2) 微小循環における白血球-血管内皮細胞の相互作用におけるiPLA<sub>2</sub>γの役割

微小循環における白血球と血管内皮細胞の相互作用は急性炎症の過程に不可欠で、細胞表面に発現した複数の接着分子によって制御されている。その過程は、白血球が血管内皮細胞に沿って転回(ローリング)する、血管内皮細胞と強固に接着する、白血球は血管内皮細胞を通過して血管外へ遊走する、3つの段階に区分される。生体顕微鏡は、白血球と血管内皮細胞の相互作用を*in vivo*で視覚的に評価する観察システムである。この相互作用に対するiPLA<sub>2</sub>、cPLA<sub>2</sub>、sPLA<sub>2</sub>の役割を検証するため、PAFで刺激したラット腸間膜細静脈における白血球の動態を解析した。

白血球のローリングに関して、PAF刺激前では、各群のローリングはsham群(PAF刺激なし)と同程度であった。一方、PAF刺激後は、sham群と比較して、DMSO群(positive control)のローリング細胞数は約2倍に増加した。しかしながら、4種類のPLA<sub>2</sub>特異的阻害剤投与群では、ローリングする細胞数の減少は認められなかった(図6)。



A: Sham群 B: DMSO群 C: R-BEL群

表1

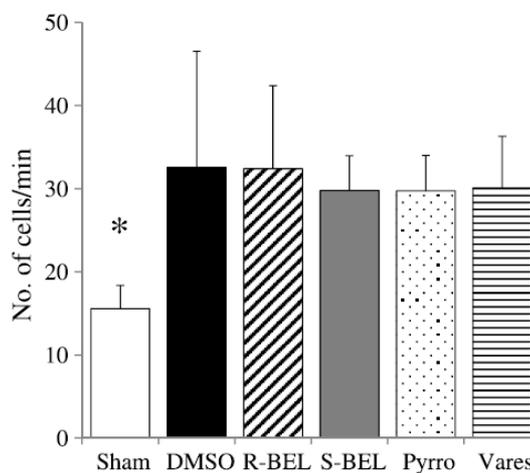


図6

血管内皮細胞への接着について、PAF 添加前の細胞接着数は sham 群と等しい細胞数であった。しかしながら、PAF 刺激によって、DMSO 群の接着細胞数は、sham 群と比較して約 4 倍に増加した。4 種類の PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤のうち R-BEL のみが sham 群のレベルまで細胞接着を抑制した (図 7、表 1)。

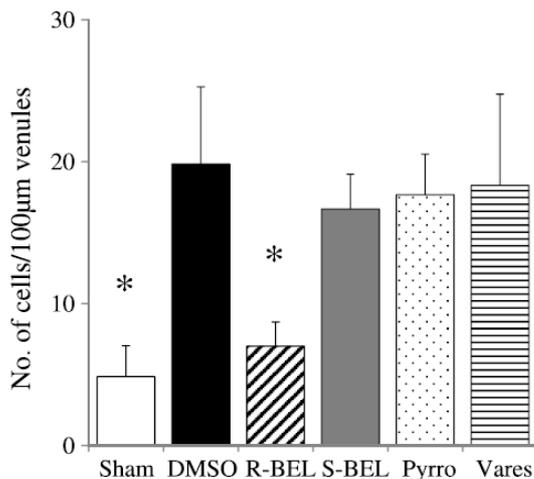


図 7

本研究では、好中球機能の発現機序における PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>, sPLA<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>) の役割を解明するため、それぞれの酵素に対する特異的阻害剤を使用して検討した。特に iPLA<sub>2</sub> 酵素 (iPLA<sub>2</sub>β, iPLA<sub>2</sub>γ) と急性炎症との関連性についての報告は少なく、これらのサブタイプの役割も明らかにした。我々の *in vitro* 研究の結果から、iPLA<sub>2</sub>γ は、受容体依存のおよび非受容体依存の刺激によって誘導される生物活性のシグナル伝達に参与することが示唆された。さらに生体顕微鏡を使用した *in vivo* 実験もこの仮説を裏付けている。

アラキドン酸は、好中球機能の発現に関する主要なシグナル伝達物質の一つである。cPLA<sub>2</sub> は選択的にアラキドン酸を産生する酵素であるが、cPLA<sub>2</sub> 酵素を特異的に阻害する pyrrophenone はヒト好中球やラット白血球の生物活性を抑制しなかった。また、cPLA<sub>2</sub> ノックアウトマウスを使用した Rubin らの研究によると、ノックアウトマウスの好中球活性 (活性酸素産生、脱顆粒、接着分子発現) は正常に機能したことから、アラキドン酸は細胞毒性の発現に寄与しないのかもしれない。一方、iPLA<sub>2</sub>γ の代謝産物の一つである 2-arachidonoyl lysophosphatidylcholine (2-AA-LPC) は、リゾホスホリパーゼ C により 2-arachidonoylglycerol (2-AG) に代謝される。内因性カンナビノイドである 2-AG は好中球のさまざまな細胞機能を誘導することから、2-AA-LPC や 2-AG などの iPLA<sub>2</sub>γ の代謝産物がシグナル伝達物質として働いている可能性がある。好中球の生物活性における iPLA<sub>2</sub>γ の役割を理解するためには、他のシグナル伝達物質との関連性についても検証が必要であろう。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Mikami S, Aiboshi J, Kobayashi T, Kojima M, Morishita K, Otomo Y: Discrete roles of intracellular phospholipases A<sub>2</sub> in human neutrophil cytotoxicity. *J. Trauma Acute Care Surg.* 79 (2): 238-246 (2015). 査読有り

2. Kojima M, Aiboshi J, Shibata M, Kobayashi T, Otomo Y: Novel role of group VIB Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub>γ in leukocyte-endothelial cell interactions: An intravital microscopic study in rat mesentery. *J. Trauma Acute Care Surg.* 79 (5): 782-789 (2015). 査読有り

3. 相星淳一、森下幸治、三上さおり、小島光暁、本藤憲一、八木雅幸、篠美和、小林哲幸、大友康裕：急性炎症病態におけるカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の役割. *日本外傷学会雑誌* 30: 47-55, 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 小林哲幸、鬼澤慶子、竹田宏美、三上さおり、相星淳一：ヒト好中球活性化におけるアラキドン酸遊離とホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の役割. 第 39 回日本医用マスペクトル学会年会 平成 26 年 10 月 16 - 17 日(三井ガーデンホテル、千葉県千葉市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

相星 淳一 (AIBOSHI, Junichi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50256913

(2) 研究分担者

小林 哲幸 (KOBAYASHI, Tetsuyuki)

お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：50178323

(3) 研究分担者

柴田 政廣 (SHIBATA, Masahiro)

芝浦工業大学・システム工学部・教授

研究者番号：60158954